

09/485434

416 Rec'd PCT/PTO 09 FEB 2000

**Nucleinsäuremolekül-Satz für *Salmonella*-Nachweis,  
Nucleinsäuren, Kit und Verwendung**

Die Kontamination von Produkten der Lebensmittel- und Pharmaindustrie über die eingesetzten Rohstoffe oder während des Produktions- oder Verpackungsprozesses durch pathogene Mikroorganismen stellt ein großes Problem dar. *Salmonellen* gehören zu den wichtigsten durch Lebensmittel übertragenen Krankheitserregern des Menschen. Da die Detektion und Identifikation von *Salmonellen* mit konventionellen mikrobiologischen Nachweisverfahren sehr zeitaufwendig ist - für die in gesetzlichen Vorschriften (LMBG, FDA) geforderte Anreicherung und nachfolgende Serotypisierung werden mindestens fünf Tage benötigt - besteht ein großer Bedarf nach alternativen Schnellmethoden.

Für den routinemäßigen Einsatz zur Erfassung von Mikroorganismen sind in den letzten Jahren eine Reihe neuer

Methoden entwickelt worden. Hierzu zählen immunologische Verfahren, die auf dem Einsatz polyvalenter oder monoklonaler Antikörper beruhen und Verfahren, bei denen Nucleinsäure-Sonden zum Nachweis mittels Hybridisierung an keimspezifische Nucleinsäuren eingesetzt werden. Als weitere Methoden werden diejenigen Verfahren beschrieben, die auf einer spezifischen Nucleinsäure-Amplifikation basieren, mit oder ohne anschließende Bestätigungsreaktion durch Nucleinsäure-Hybridisierung. Geeignete Verfahren zur Amplifikation von Nucleinsäuren sind z.B. die Polymerase-Kettenreaktion (polymerase chain reaction, PCR) [US Patente 4,683,195; 4,683,202; und 4,965,188], die Ligase-Kettenreaktion [WO Veröffentlichung 89/09835], die "self-sustained sequence replication" [EP 329,822], das "transcription based amplification system" [EP 310,229] und das Q $\beta$  RNA-Replikase-System [US Patent 4,957,858].

Die genannten auf Nucleinsäuren basierenden Verfahren sind so sensitiv, daß, anders als bei konventionellen mikrobiologischen Verfahren, eine langwierige Anreicherung des nachzuweisenden Mikroorganismus aus der zu untersuchenden Probe entfällt. Eine Untersuchung auf An- oder Abwesenheit von z.B. Salmonellen ist daher bei Anwendung der genannten auf Nucleinsäuren basierenden Verfahren in der Regel innerhalb eines Arbeitstages abgeschlossen.

Einige Nucleinsäuresequenzen zum Nachweis von Salmonellen mit der Polymerase-Kettenreaktion sind bekannt. Nachteilig ist jedoch, daß bei Einsatz dieser Nucleinsäuresequenzen als Primer bei der Polymerase-Kettenreaktion falsch positive [WO 95/33854] oder falsch negative [WO 92/01056; WO 95/00664; WO 92/01056; WO 93/04202] Resultate auftreten. In anderen Fällen sind nur eine unzureichende Anzahl von Stämmen aller 7 *Salmonella*-Subspezies untersucht [WO 92/08805; WO 94/25597; DE 4337295].

so daß bisher unklar ist, ob die jeweiligen Nucleinsäuresequenzen zum Nachweis aller *Salmonella*-Stämme geeignet sind.

Vorteilhaft an z.B. den in der internationalen Patentanmeldung WO 95/00664 beschriebenen Primern und Sonden ist, daß sie den hochselektiven Nachweis von Bakterien der Gattung *Salmonella* erlauben, ohne daß falsch positive Resultate auftreten.

Nachteilig beim Einsatz der Oligonucleotide gemäß WO 95/00664 in Amplifikationsverfahren wie der Polymerase-Kettenreaktion ist jedoch die Tatsache, daß mit keinem der beschriebenen Primerpaare alle Vertreter der 7 *Salmonella*-Subspezies erfaßt werden. So werden beispielsweise beim Einsatz der Primer ST11/ST15 mehrere Vertreter der Subspezies IIIa (subsp. *arizonaee*), beim Einsatz der Primer ST11/ST14 mehrere Vertreter der Subspezies I (subsp. *enterica* Serovar. *Blockley*) und der Subspezies IIIa (subsp. *arizonaee*) nicht detektiert.

Ziel der hier dargestellten Erfindung war die Optimierung der in WO 95/00664 beschriebenen Nachweisverfahren durch Ermittlung von Nucleinsäuresequenzen, deren Einsatz als Primer und/oder Sonden eine möglichst vollständige Erfassung aller Vertreter der Gattung *Salmonella* sicherstellt.

Gemäß einer Ausführungsform wird die der Erfindung zugrundeliegende Aufgabe durch einen Satz von Nucleinsäuremolekülen gelöst, mit dem sich bei einem Verfahren zum Nachweis von Vertretern von *Salmonella enterica* subsp. *enterica*, *salamae*, *arizonaee*, *diarizonae*, *houtenae*, *bongori* und *indica* sämtliche Vertreter dieser Subspezies nachweisen lassen, wobei der Satz dadurch gewinnbar ist, daß man

- (a) in an sich bekannter Weise mit Hilfe eines Nucleinsäure-Isolats eines Vertreters einer der genannten *Salmonella enterica*-Subspezies ein erstes Nucleinsäuremolekül (Nucleinsäuremolekül 1) gewinnt oder ableitet, das sich spezifisch als Primer oder Sonde zum Nachweis dieses Vertreters

oder weiterer oder aller Vertreter dieser einen *Salmonella enterica*-Subspezies und gegebenenfalls zusätzlich von Vertretern weiterer *Salmonella enterica*-Subspezies eignet,

(b) in an sich bekannter Weise mit Hilfe eines Nucleinsäure-Isolats eines anderen Vertreters einer der genannten *Salmonella enterica*-Subspezies ein zweites Nucleinsäuremolekül (Nucleinsäuremolekül 2) gewinnt oder ableitet, das sich spezifisch als Primer oder Sonde zum Nachweis dieses Vertreters oder weiterer oder aller Vertreter dieser anderen *Salmonella enterica*-Subspezies und gegebenenfalls zusätzlich von Vertretern von weiteren der genannten *Salmonella enterica*-Subspezies eignet und

(c) sofern sich mit den gemäß (a) und (b) gewinnbaren Nucleinsäuremolekülen nicht bereits alle Vertreter der genannten *Salmonella enterica*-Subspezies nachweisen lassen, die Gewinnung oder Ableitung von Nucleinsäuremolekülen gemäß (a) und/oder (b) so lange fortsetzt, bis sich mit dem gewonnenen oder abgeleiteten Satz von Nucleinsäuremolekülen alle Vertreter der genannten *Salmonella enterica*-Subspezies nachweisen lassen.

Bei einem abgeleiteten Nucleinsäuremolekül kann es sich um ein Nucleinsäuremolekül handeln, das mit dem gewonnenen Nucleinsäuremolekül hybridisierbar ist und vorzugsweise dieselbe Basenzahl aufweist, wobei Hybridisierungsbedingungen sein können:

Temperatur  $\geq 25$  °C und 1 M NaCl-Konzentration.

Bei einem abgeleiteten Nucleinsäuremolekül kann es sich beispielsweise um ein Nucleinsäuremolekül handeln, dessen Sequenz mittels Computer-designing bestimmt worden ist und das nachfolgend durch chemische Synthese hergestellt und gewonnen worden ist.

Man kann die Lösung der der Erfindung zugrundeliegenden Aufgabe auch dahingehend beschreiben, daß ein oder mehrere Nucleinsäuremolekül(e) Y (Z, ...) vorgesehen werden, wobei diese(s) Nucleinsäuremolekül(e) dadurch gekennzeichnet ist (sind), daß der Einsatz dieses(r) Nucleinsäuremoleküls(e) - zusätzlich zum Einsatz eines Nucleinsäuremoleküls (X) - in

einem Verfahren zum Nachweis von Bakterien der Gattung *Salmonella* den Nachweis auch von solchen *Salmonella*-Stämmen oder *Salmonella*-Isolaten ermöglicht, deren Nachweis durch Einsatz des Nucleinsäuremoleküls (X) nicht bzw. nur mit geringerer Sensitivität gelingt.

Der erfindungsgemäße Satz von Nucleinsäuremolekülen kann dadurch gekennzeichnet sein, daß die Nucleinsäure-Isolate phylogenetisch konservierte Basensequenzen oder Bereiche dieser Basensequenzen umfassen oder darstellen. Für den Begriff der phylogenetisch konservierten Basensequenz vgl. beispielsweise WO 95/00664 oder Herder's Lexikon der Biochemie und Molekularbiologie, Ergänzungsstand 1995, Seite 132, Spektrum, Herstellung etc..

Der erfindungsgemäße Satz von Nucleinsäuremolekülen kann dadurch gekennzeichnet sein, daß die einzelnen Nucleinsäuremoleküle oder daß einzelne der Nucleinsäuremoleküle (i) an verschiedenen phylogenetisch konservierten Basensequenzen oder (ii) an ein und derselben phylogenetisch konservierten Basensequenz an sich nicht überlappenden Sequenzbereichen oder (iii) an ein und derselben phylogenetisch konservierten Basensequenz an sich überlappenden Sequenzbereichen hybridisieren.

Der erfindungsgemäße Satz von Nucleinsäuremolekülen oder ein erfindungsgemäßer Satz von Nucleinsäuremolekülen, mit dem sich bei einem Verfahren zum Nachweis von Vertretern von *Salmonella enterica* subsp. *enterica*, *salamae*, *arizonae*, *diarizonae*, *houtenae*, *bongori* und *indica* sämtliche Vertreter dieser Subspezies nachweisen lassen, kann dadurch gekennzeichnet sein, daß der Satz für ein einzelnes, für mehrere seiner einzelnen oder für jedes seiner einzelnen Nucleinsäuremoleküle jeweils mindestens ein weiteres Nucleinsäuremolekül umfaßt, das in

einem Bereich von mindestens 10 aufeinanderfolgenden Nucleotiden ihrer Nucleotidkette in weniger als 100 %, aber zumindest in 80 % der Basensequenz übereinstimmt.

Ein derartiger erfindungsgemäßer Satz von Nucleinsäuremolekülen kann dadurch gekennzeichnet sein, daß der Satz für ein einzelnes, für mehrere seiner einzelnen oder für jedes seiner einzelnen Nucleinsäuremoleküle jeweils mindestens ein weiteres Nucleinsäuremolekül umfaßt, das in einem Bereich von mindestens 10 aufeinanderfolgenden Nucleotiden ihrer Nucleotidkette in genau einer Basenposition vom anderen bzw. weiteren Nucleinsäuremolekül abweicht.

Ein erfindungsgemäßer Satz von Nucleinsäuremolekülen kann dadurch gekennzeichnet sein, daß er ein oder mehrere, jedoch nicht ausschließlich solche Nucleinsäuremoleküle umfaßt, bei denen es sich um Fragmente der SEQ ID NO 1 gemäß WO 95/00664 oder der hierzu komplementären Sequenz handelt.

Ferner kann ein erfindungsgemäßer Satz von Nucleinsäuremolekülen dadurch gekennzeichnet sein, daß die einzelnen Nucleinsäuremoleküle an denselben Strang von Nucleinsäure-Isolaten von Vertretern von *Salmonella enterica*-Subspezies hybridisieren, die dem Verfahren zu ihrem Nachweis unterworfen werden.

Außerdem wird die der Erfindung zugrundeliegende Aufgabe durch ein Nucleinsäuremolekül gelöst, das zu einem erfindungsgemäßen Satz von Nucleinsäuremolekülen gehört oder für einen derartigen Satz verwendbar ist, wobei das Nucleinsäuremolekül dadurch gekennzeichnet ist, daß die Sequenz des Nucleinsäuremoleküls in einem Bereich von mindestens 10 aufeinanderfolgenden Nucleotiden seiner Nucleotidkette exakt mit einem Sequenzbereich mindestens eines Vertreters der genannten *Salmonella enterica*-Subspezies übereinstimmt, wobei der

Sequenzbereich eine phylogenetisch konservierte Basensequenz oder einen Bereich dieser Basensequenz umfaßt oder darstellt.

Ein derartiges erfindungsgemäßes Nucleinsäuremolekül kann dadurch gekennzeichnet sein, daß es in einem Bereich von mindestens 10 aufeinanderfolgenden Nucleotiden seiner Nucleotidkette zu 100 % oder zu mindestens 80 % identisch ist zu einer entsprechenden Zahl aufeinanderfolgender Nucleotide einer oder mehrerer der folgenden Sequenzen oder ihrer komplementären Sequenzen:

SEQ ID NO: 1 ATGGATCAGAATAACGCCCG  
SEQ ID NO: 2 ATGGATCAGAATAACACCCCG  
SEQ ID NO: 3 CAGAATAACGCCCGTTCGGC  
SEQ ID NO: 4 CAGAATAACACCCCGTTCGGC  
SEQ ID NO: 5 CAGAATAACGCCCGTTCAGC  
SEQ ID NO: 6 CAACCTAACTTCTGCGCCAG  
SEQ ID NO: 7 CAACCTAACTTCTGCACCAG  
SEQ ID NO: 8 CAACCTAACCTCTGCGCCAG  
SEQ ID NO: 9 CAACCTAACTTCTGCGCCAG

Ferner wird die der Erfindung zugrundeliegende Aufgabe durch ein Nucleinsäuremolekül gelöst, das dadurch gekennzeichnet ist, daß es hinsichtlich seiner Sequenz zu einem erfindungsgemäßem und vorstehend gekennzeichneten Nucleinsäuremolekül homolog ist und bei mindestens 10 aufeinanderfolgenden Nucleotiden seiner Nucleotidkette

- (i) mit einem erfindungsgemäßem vorstehend gekennzeichneten Nucleinsäuremolekül identisch ist oder
- (ii) in nicht mehr als einem Nucleotid von einem erfindungsgemäßem vorstehend gekennzeichneten Nucleinsäuremolekül abweicht oder
- (iii) in nicht mehr als zwei Nucleotiden von einem erfindungsgemäßem vorstehend gekennzeichneten Nucleinsäuremolekül abweicht.

Ein erfindungsgemäßes Nucleinsäuremolekül kann dadurch gekennzeichnet sein, daß es 10 bis 250 und vorzugsweise 15 bis 30 Nucleotide lang ist.

Ferner kann ein erfindungsgemäßes Nucleinsäuremolekül dadurch gekennzeichnet sein, daß es einzelsträngig ist oder einen komplementären Strang aufweist.

Ferner kann ein erfindungsgemäßes Nucleinsäuremolekül dadurch gekennzeichnet sein, daß es

- (i) als DNA oder
- (ii) als (i) entsprechende RNA oder
- (iii) als PNA vorliegt, wobei das Nucleinsäuremolekül gegebenenfalls in einer für analytische Nachweisverfahren, insbesondere auf Basis von Hybridisierung und/oder Amplifizierung, in an sich bekannter Weise modifiziert oder markiert ist.

Ferner kann ein erfindungsgemäßes Nucleinsäuremolekül dadurch gekennzeichnet sein, daß es sich um ein modifiziertes oder markiertes Nucleinsäuremolekül handelt, bei dem bis zu 20 % der Nucleotide von mindestens 10 aufeinanderfolgenden Nucleotiden seiner Nucleotidkette Bausteine darstellen, die für Sonden und/oder Primer an sich bekannt sind, insbesondere Nucleotide darstellen, die bei Bakterien nicht natürlich vorkommen.

Ferner kann ein erfindungsgemäßes Nucleinsäuremolekül dadurch gekennzeichnet sein, daß es sich um ein modifiziertes oder markiertes oder zusätzlich modifiziertes oder markiertes Nucleinsäuremolekül handelt, das in einer für analytische Nachweisverfahren an sich bekannten Weise eine oder mehrere radioaktive Gruppen, farbige Gruppen, fluoreszierende Gruppen, Gruppen zur Immobilisierung an fester Phase, Gruppen für eine indirekte oder direkte Reaktion, insbesondere für eine enzymatische Reaktion, vorzugsweise mit Hilfe von Antikörpern,

Antigenen, Enzymen und/oder Substanzen mit Affinität zu Enzymen oder Enzymkomplexen, und/oder anderweitige an sich bekannte modifizierende oder modifizierte Gruppen nucleinsäureähnlichen Aufbaus aufweist.

Außerdem wird die der Erfindung zugrundeliegende Aufgabe durch einen Kit für analytische Nachweisverfahren gelöst, insbesondere zum Nachweis von Bakterien der Gattung *Salmonella*, wobei dieser Kit gekennzeichnet ist durch

- (i) einen Satz von erfindungsgemäßen Nucleinsäuremolekülen oder
- (ii) durch ein oder mehrere erfindungsgemäße Nucleinsäuremoleküle.

Ein erfindungsgemäßer Kit kann also einen erfindungsgemäßen Satz von Nucleinsäuremolekülen oder ein oder mehrere erfindungsgemäße Nucleinsäuremoleküle umfassen, wobei daneben die für Nucleinsäurehybridisierungen oder Nucleinsäureamplifizierungen üblichen sonstigen Komponenten vorgesehen sind, beispielsweise eine Polymerase, eine Reverstranscriptase, eine Ligase oder eine RNA-Polymerase; vgl. beispielsweise WO 95/00664.

Vorzugsweise wird ein Satz von Nucleinsäuremolekülen des erfindungsgemäßen Kits synthetisch, in zumindest zwei voneinander getrennten Syntheseansätzen hergestellt. Der erfindungsgemäße Kit umfaßt vorzugsweise keine degenerierten Nucleinsäuremoleküle.

Schließlich wird die der Erfindung zugrundeliegende Aufgabe durch die Verwendung eines Satzes von erfindungsgemäßen Nucleinsäuremolekülen oder eines erfindungsgemäßen Kits zum Nachweis der An- oder Abwesenheit von Bakterien gelöst, welche einer Gruppe von Bakterien der Gattung *Salmonella* angehören,

insbesondere von Vertretern der vorstehend genannten *Salmonalla enterica*-Subspezies.

Für die erfindungsgemäße Verwendung kann man eine Nucleinsäurehybridisierung und/oder eine Nucleinamplifizierung durchführen.

Als Nucleinsäureamplifikation kann man eine Polymerase-Kettenreaktion (PCR) durchführen.

Für die erfindungsgemäße Verwendung kann man für die nachzuweisenden Bakterien und die nicht-nachzuweisenden Bakterien Unterschiede ihrer genomischen DNA und/oder RNA an mindestens einer Nucleotidposition im Bereich eines erfindungsgemäßen Nucleinsäuremoleküls ermitteln und Vertreter einer Gruppe von Bakterien der Gattung *Salmonella* nachweisen, insbesondere von Vertretern der genannten *Salmonella enterica*-Subspezies.

Zur Detektion von Salmonellen mittels Nucleinsäure-Hybridisierung oder -Amplifikation werden *Salmonella*-spezifische Oligonucleotide eingesetzt. *Salmonella*-spezifische Oligonukleotide sind Nucleinsäuremoleküle, 10 bis 250 Basen (vorzugsweise 15 bis 30 Basen) lang, deren Basensequenz charakteristisch für Salmonellen ist: Bei Einsatz dieser Oligonukleotide als Primer oder Sonden erfolgt - unter geeigneten Reaktionsbedingungen - eine Hybridisierung/Amplifikation nur dann, wenn DNA der nachzuweisenden Salmonellen in der Untersuchungsprobe vorhanden ist, nicht aber wenn DNA anderer Bakterien vorhanden ist.

Wie weiter unten beschrieben, können unter bestimmten Voraussetzungen auch nicht-spezifische Oligonukleotide als Primer oder Sonden eingesetzt werden. Solche Oligonukleotide erlauben Hybridisierung bzw. Amplifikation nicht nur dann, wenn

*Salmonella*-DNA in der Probe anwesend ist, sondern auch in Anwesenheit von DNA eines Bakteriums oder mehrerer Bakterien, das (die) nicht zur Gattung *Salmonella* gehört(en).

Da in hoch-konservierten Genregionen selbst unter sehr nahe verwandten Bakterien Austausche (z.B. Punktmutationen) in der DNA vorkommen können, sind für die Auswahl geeigneter Oligonukleotide umfangreiche DNA-Sequenzierungen bzw. Spezifitätstests (z.B. mittels Durchführung der PCR) notwendig. Dies gilt in gleichem Maße für nachzuweisende Bakterien (i.e. *Salmonellen*) wie nicht-nachzuweisende Bakterien (i.e. Bakterien, die nicht zur Gattung *Salmonella* gehören).

Zum Nachweis von *Salmonellen* werden Nucleinsäuren, vorzugsweise genomische DNA, zunächst aus den in einer zu untersuchenden Probe bzw. Bakterienkultur enthaltenen Zellen freigesetzt. Mittels Nucleinsäurehybridisierung kann dann unter Einsatz der erfindungsgemäßen *Salmonella*-spezifischen Oligonukleotide als Sonde der direkte Nachweis von *Salmonella*-Nucleinsäuren in der zu untersuchenden Probe erfolgen. Geeignet hierzu sind verschiedene dem Fachmann bekannte Verfahren, wie z.B. "Southern blot" oder "dot blot".

Bevorzugt ist jedoch, vor allem wegen der höheren Empfindlichkeit, der indirekte Nachweis, bei dem die gesuchten DNA/RNA-Sequenzen zunächst mittels der o.g. Verfahren zur Amplifikation von Nucleinsäuren, vorzugsweise PCR, amplifiziert werden. Die Amplifikation von DNA/RNA erfolgt durch Einsatz von *Salmonella*-spezifischen Oligonukleotiden. Dabei werden nur dann spezifische Amplifikate gebildet, wenn *Salmonella*-DNA/RNA in der zu untersuchenden Probe vorhanden ist. Durch eine nachgeschaltete Detektionsreaktion unter Verwendung von *Salmonella*-spezifischen Oligonukleotiden als Sonden kann die Spezifität des Nachweisverfahrens erhöht werden. Ebenso ist die

Verwendung von nicht-spezifischen Oligonukleotiden als Sonden möglich.

Alternativ kann die Amplifikation auch in Anwesenheit eines oder mehrerer nicht-spezifischer Oligonucleotide durchgeführt werden, so daß möglicherweise auch DNA/RNA anderer, nicht-nachzuweisender Mikroorganismen amplifiziert werden kann. Ein derartiges Amplifikationsverfahren ist in der Regel weniger spezifisch und sollte daher durch eine nachfolgende Detektionsreaktion mit *Salmonella*-spezifischen Oligonucleotiden als Sonde abgesichert werden.

Dem Fachmann sind verschiedene Verfahren bekannt, mit denen die bei den indirekten Verfahren entstehenden Amplifikationsprodukte nachgewiesen werden können. Dazu gehören u.A. die Visualisierung mittels Gelelektrophorese, die Hybridisierung von Sonden an immobilisierte Reaktionsprodukte [gekoppelt an Nylon- oder Nitrocellulose-Filter ("Southern blots") oder z.B. an "beads" oder Mikrotiterplatten] und die Hybridisierung der Reaktionsprodukte an immobilisierte Sonden (z.B. "reverse dot blots" oder mit Sonden gekoppelte "beads" oder Mikrotiterplatten).

Es sind eine Vielzahl verschiedener Varianten beschrieben, mit denen die beschriebenen *Salmonella*-spezifischen bzw. nicht-spezifischen Oligonukleotide zum Einsatz als Sonden und/oder Primer in direkten oder indirekten Nachweisverfahren markiert bzw. modifiziert werden können. So können diese beispielsweise radioaktive, farbige oder fluoreszierende Gruppen enthalten oder Gruppen, die eine Immobilisierung an eine feste Phase erlauben oder anderweitig modifizierte bzw. modifizierende Gruppen wie z.B. Antikörper, Antigene, Enzyme bzw. andere Substanzen mit Affinität zu Enzymen oder Enzymkomplexen. Sonden bzw. Primer können entweder natürlich vorkommende oder synthetisch hergestellte doppelsträngige oder einzelsträngige

DNA oder RNA sein bzw. modifizierte Formen von DNA oder RNA, wie z.B. PNA (bei diesen Molekülen sind die Zucker-Einheiten durch Aminosäuren oder Peptide ausgetauscht). Einzelne oder mehrere Nucleotide der Sonden oder Primer können gegen analoge Bausteine (wie z.B. in der Ziel-Nucleinsäure nicht natürlich vorkommende Nucleotide) ersetzt sein. Bei den o.g. indirekten Nachweisverfahren kann die Detektion auch über ein intern-markiertes Amplifikat geführt werden. Dies kann z.B. über den Einbau von modifizierten (z.B. von mit Digoxigenin oder Fluorescein gekoppelten) Nukleosidtriphosphaten während der Amplifikationsreaktion erfolgen.

Geeignet als erfindungsgemäße *Salmonella*-spezifische Oligonukleotide sind Nucleinsäuren, vorzugsweise 15 bis 30 Basen lang, die mindestens in einer 10 Basen langen Sequenz mit den Sequenzen 1 bis 10 oder den hierzu komplementären Sequenzen übereinstimmen. Geringere Abweichungen (1 bis 2 Basen) in dieser 10 Basen langen Sequenz sind möglich, ohne daß die jeweils angegebene Spezifität bei der Amplifikation und/oder Hybridisierung verloren geht. Dem Fachmann ist bekannt, daß im Falle solcher geringeren Abweichungen die Reaktionsbedingungen entsprechend verändert werden müssen.

Um eine vollständige Detektion aller *Salmonella*-Stämme mit Hilfe der in WO 95/00664 umrissenen DNA-Region zu ermöglichen, waren umfangreiche DNA-Sequenzanalysen erforderlich. Die Sequenz dieses DNA-Bereiches wurde von 37 ausgewählten *Salmonella*-Stämmen aller 7 Subspezies bestimmt (für die meisten Stämme die Sequenz der zwischen den Primern ST15 und ST11 liegenden DNA-Region; dies entspricht Position 1275 bis 1654 von SEQ ID NO: 1 in WO 95/00664). Mögliche experimentelle Vorgehensweisen sind dem Fachmann bekannt und sollen hier nicht im einzelnen beschrieben werden, sondern die Ergebnisse kurz zusammengefasst werden. DNA der ausgewählten *Salmonella*-Stämme wurde mittels Standardverfahren präpariert, der relevante

Bereich durch PCR amplifiziert und nachfolgend sequenziert. Bei der PCR sowie der nachfolgenden Sequenzierung wurden für die meisten *Salmonella*-Stämme folgende Primer eingesetzt:

ST11: AGCCAACCATTGCTAAATTGGCGCA (siehe claim 3, WO 95/00664)  
ST15: GGTAGAAATTCCCAGCGGGTACTG (siehe claim 3, WO 95/00664)

Da jedoch mit mehreren Stämmen der Subspezies IIIa, IV, V und VI mit diesem Primerpaar keine, oder nur ungenügende Amplifikation stattfand, wurden in diesen Fällen folgende Primer für die PCR und die Sequenzierung eingesetzt:

ST11: AGCCAACCATTGCTAAATTGGCGCA (siehe claim 3, WO 95/00664)  
ST14: TTTGCGACTATCAGGTTACCGTG (siehe claim 3, WO 95/00664)

Ein Vergleich der DNA-Sequenzen aller 37 *Salmonella*-Stämme ergab, daß es sich zwar insgesamt um einen konservierten DNA-Bereich handelt, daß jedoch der Grad der Konservierung auf den ersten Blick nur bedingt geeignet erschien, um *Salmonella*-spezifische Oligonukleotide abzuleiten. Selbst in den höchstkonservierten Bereichen waren bei einzelnen der sequenzierten Stämme Basenaustausche zu beobachten. Interessanterweise stellte sich heraus, daß viele der Basenaustausche nur innerhalb einer Subgruppe vorkommen und daß diese zudem innerhalb dieser Subgruppe meist konserviert sind. Dies legte die Möglichkeit nahe, mehr als zwei Primer bei der PCR einzusetzen, um eine Amplifikation auch von solchen Varianten zu ermöglichen, bei denen im Bereich der Primerbindungsstellen ein oder mehrere Basenaustausche vorhanden sind. Wie dem Fachmann bekannt, werden hierzu üblicherweise degenerierte Primer, oder aber Primer mit Desoxyinosin an den variablen Stellen, eingesetzt. Daher wurden aus dem o. g. Sequenzvergleich mehrere degenerierte Oligonukleotide abgeleitet, die sich potentiell als Primer für die Detektion aller *Salmonella enterica* Subspezies eigneten. Es zeigte sich

jedoch, daß diese degenerierten Primer nur bedingt für den PCR-Nachweis geeignet sind, da sie, insbesondere bei Sequenzbereichen mit hoher Komplexität, ein vermehrtes Auftreten unspezifischer Reaktionsprodukte zu Folge haben. Da bei Auftreten solcher unspezifischen Reaktionsprodukte die Sensitivität des PCR-Nachweises in der Regel leidet, wurde eine andere Vorgehensweise erprobt. Es wurden "komplementierende" Primer bei der PCR eingesetzt. Im Gegensatz zu degenerierten Primern, bei denen alle möglichen Kombinationen der einzelnen Basenaustausche in der Primer-Mischung repräsentiert sind (Anzahl der Primer =  $2^x \times 3^y \times 4^z$ , wobei x, y und z die Anzahl der Positionen sind, an denen zwei, drei oder vier verschiedene Basen im Bereich der Primerbindungsstelle beobachtet werden) sind bei solchen komplementierenden Primern nur die tatsächlich vorkommenden Sequenzen vorhanden. Der Vorteil gegenüber degenerierten Primern besteht in der geringeren Komplexität der erfindungsgemäßen Primer-Mischung, wodurch die Wahrscheinlichkeit des Entstehens unspezifischer Amplifikationsprodukte deutlich herabgesetzt ist. Wie sich in mehreren Experimenten herausstellte, ist dies insbesondere vorteilhaft bei einem PCR-Nachweis aus Proben mit einem hohen Gehalt von "unspezifischer" DNA (DNA, die nicht aus nachzuweisenden Bakterien stammt), da ansonsten die Sensitivität des Nachweises drastisch vermindert sein kann.

Ein großer Vorteil beim Einsatz von komplementierenden Oligonukleotiden/Primern besteht in der Möglichkeit der Optimierung von bestehenden Nachweisverfahren. So können u.U. einzelne falsch negative Ergebnisse dadurch beseitigt werden, daß Oligonukleotide mit der Sequenz der zuvor nicht erfassten Stämme zusätzlich bei der PCR und/oder der Hybridisierungsreaktion eingesetzt werden.

Der DNA-Sequenzvergleich ergab mehrere kürzere DNA-Bereiche, die für die beschriebene Strategie (Einsatz von insgesamt  $\geq 3$  Primern in der PCR) zur Optimierung des *Salmonella*-Nachweisverfahrens potentiell geeignet schienen. Das nachfolgende Beispiel soll dies verdeutlichen.

Beispiel 1: Nachweis von *Salmonella*-Stämmen sämtlicher 7 Subspezies mit der Polymerase-Kettenreaktion

Die folgenden 3 Abschnitte der sequenzierten DNA-Region sollen als Beispiele für die beobachteten Sequenzvariationen dienen:

Abschnitt I (Position 1336 bis 1355 von SEQ ID NO: 1 in WO 95/00664)

SEQ ID NO: 1 ATGGATCAGAATAACGCCCG

SEQ ID NO: 2 ATGGATCAGAATAACACCCCG

Abschnitt II (Position 1342 bis 1361 von SEQ ID NO: 1 in WO 95/00664)

SEQ ID NO: 3 CAGAATAACGCCCCGTTCGGC

SEQ ID NO: 4 CAGAATAACACCCCGTTCGGC

SEQ ID NO: 5 CAGAATAACGCCCCGTTCAGC

Abschnitt III (komplementär zu Position 1483 bis 1502 von SEQ ID NO: 1 in WO 95/00664)

SEQ ID NO: 6 CAACCTAACTTCTGCGCCAG

SEQ ID NO: 7 CAACCTAACTTCTGCACCAG

SEQ ID NO: 8 CAACCTAACCTCTGCGCCAG

SEQ ID NO: 9 CAACCTAACTTCTGCGGCAG

SEQ ID NO: 10 CAGCCTAACTTCTGCGCCAG

Zur Überprüfung ob diese Sequenz-Abschnitte für den Nachweis sämtlicher *Salmonella*-Stämme der 7 Subspezies geeignet sind,

wurden die Oligonukleotide Sa 1 bis 10 in folgenden Kombinationen in die PCR eingesetzt:

Primerkombination 1:

Sa1/Sa2	(je 0,2 µM Endkonzentration)
Sa6/Sa7/Sa8/Sa9/Sa10	(je 0,08 µM Endkonzentration)

Primerkombination 2:

Sa3/Sa4/Sa5	(je 0,13 µM Endkonzentration)
Sa6/Sa7/Sa8/Sa9/Sa10	(je 0,08 µM Endkonzentration)

Aus Reinkulturen der in Tabelle 1a aufgeführten Salmonellen-Stämme wurde DNA mittels Standardverfahren isoliert. Je ca. 10 bis 100 ng dieser DNA-Präparationen wurde dann in Gegenwart von Primerkombination 1 bzw. Primerkombination 2, 200 µM dNTP's (Boehringer Mannheim), 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 16 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 67 mM Tris/HCl (pH 8,8), 0,01 % Tween 20 und 0,03 U/µl *Taq*-Polymerase (Biomaster) in die PCR eingesetzt. Die PCR wurde in einem Perkin-Elmer 9600 Thermocycler mit dem nachfolgend aufgeführten Thermoprofil durchgeführt:

- initiale Denaturierung	95 °C	5 min
- Amplifikation (35 Zyklen)	95 °C	30 sek
	63 °C	90 sek
- finale Synthese	72 °C	5 min

Nach Beendigung der PCR-Reaktion wurden die Amplifikationsprodukte mittels Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt und durch Anfärbung mit Ethidiumbromid visualisiert. Das erwartete Produkt von 167 bp (Primerkombination 1) bzw. 161 bp (Primerkombination 2) Länge wurde in sämtlichen Fällen beobachtet, in denen DNA von Stämmen der Gattung

*Salmonella* anwesend war (vergleiche Tabelle 1a), nicht aber bei Anwesenheit von DNA der anderen getesteten Bakterien (vergleiche Tabelle 1b). Nach Beendigung des Laufes wurde die in den Gelen enthaltene DNA mittels Standard-Methoden auf Nylon-Filter transferiert und mit dem am 5'-Ende mit Digoxygenin markierten Oligonukleotid ST14 (TTTGCGACTATCAGGTTACCGTGG (siehe claim 3, WO 95/00664) zur Überprüfung der insbesonderen basengetreuen Spezifität hybridisiert. Die Hybridisierung erfolgte in 5 x SSC, 2 % Blocking Reagenz, 0,1 % Laurylsarcosin, 0,02 % SDS und 5 pmol/ml Sonde für 4 h bei 60 °C. Gewaschen wurde in 2 x SSC, 0,1 % SDS für 2 x 15 min bei 60 °C. Die Detektion erfolgte nach Standard-Methoden mittels Anti-Digoxygenin/Alkalische Phosphatase-Konjugaten in Anwesenheit von 5-Brom-4-chlor-3-indolylphosphat und 4-Nitro-Blue Tetrazoliumchlorid (Fa. Boehringer Mannheim).

Auf den Filtern wurde nur in den Fällen eine Bande beobachtet, in denen zuvor auch eine Bande auf dem Agarose-Gel sichtbar war (siehe Tabelle 1a). Somit wurde sowohl mittels PCR wie auch mittels Hybridisierung die Anwesenheit der 296 getesteten *Salmonella*-Stämme aus jeder der 7 Subspezies nachgewiesen. Ein positives Signal wurde für jeden dieser Stämme sowohl mit Primerkombination 1, Primerkombination 2 sowie bei der jeweils nachfolgenden Bestätigungsreaktion durch Hybridisierung mit der Sonde ST 14 erhalten. Hingegen wurde keiner der getesteten nicht zu dieser Gattung gehörenden Bakterienstämme mit diesem System erfaßt.

Tabelle 1a: Positive Salmonella-Stämme bei der PCR-Amplifikation mit den beiden Primerkombinationen 1 oder 2 sowie bei der nachfolgenden Hybridisierung mit dem Oligonukleotid ST 14

Nr.	Subspezies	Serogruppe	Serovar
	<i>S. enterica</i> subsp. <i>enterica</i>	B	Abony
			Abortusovis
			Africana
			Agona
			Agona, Lactose +
			Arechavaleta
			Brandenburg
			Bredeney
			Chester
			Coeln
			Derby O: 5 -
			Duisburg
			Duisburg, monophasisch
			Heidelberg
			Heidelberg, O5-
			I 4, 12: d: -
			I 4, 12:-:-
			I 9, 12: l, v: -
			Indiana
			Kiambu
			Kunduchi
			Paratyphi B
			Paratyphi B H 1,2 negativ
			Paratyphi B O5 -
			Reading

		Saintpaul 05 -
		Saintpaul
		Sandiego
		Schleisheim
		Schwarzengrund
		Stanley
		Stanleyville
		Typhimurium
		Typhimurium 4 : i : 1,2 (O:5-)
		Typhimurium O : 5 -
		Typhimurium, TA 1535
		Typhimurium, TA 1537
		Typhimurium, TA 1538
		Typhimurium, TA 97
		Typhimurium, TA 98
		Typhimurium, TA 100
	C <sub>1</sub>	Augustenborg
		Bareilly
		Braenderup
		Choleraesuis
		Choleraesuis var. Decatur
		Choleraesuis var. Kunzendorf
		Colindale
		Concord
		Infantis
		Isangi
		Lille
		Livingstone
		Mbandaka
		Mikawasima
		Montevideo

		Ohio
		Oranienburg
		Oslo
		Richmond (2 Isolate getestet)
		Rissen
		Singapore
		Tennessee
		Thompson (2 Isolate getestet)
		Virchow
		I 6, 7 : - : - (2 Isolate getestet)
	C <sub>2</sub> C <sub>3</sub>	Albany (2 Isolate getestet)
		Altona
		Apeyeme
		Bardo
		Blockley
		Bovismorbificans
		Charlottenburg
		Cottbus
		Emek
		Ferruch
		Glostrup
		Goldcoast
		Haardt
		Hadar
		Kentucky
		Litchfield
		Manchester
		Manhattan
		Molade
		München

		Newport
		Takoradi
		I 6, 8 : - : -
		I 8, 20 : - : -
	D <sub>1</sub>	Dublin
		Durban
		Enteritidis
		Enteritidis
		Plasmidphage 37MD
		Enteritidis PT 4/6
		Enteritidis, Phage
		Gallinarum
		Gallinarum-Pullorum
		Israel
		Javiana
		Kapemba
		Napoli
		Panama
		Pullorum
		I 9, 12 : - : -
	D <sub>2</sub>	Plymoth
	E <sub>1</sub>	Amager
		Amsterdam O : -, 15+, 34+
		Anatum
		Anatum O 15+
		Anatum O : 10 -, O : 15+
		Birmingham
		Butantan
		Falkensee
		Give
		Lexington

		London
		Meleagridis
		Münster
		Münster, O : 10 -, 15+
		Orion
		Orion O : 10 -, 15+ 34+
		Sinstorf
		Stockholm
		Uganda (2 Isolate getestet)
		Vejle (2 Isolate getestet)
		Weltevreden
		Westhampton
		Zanzibar
		I 3, 10 : - : 6 (monophasisch)
		I 10 : - : 1,6
	E <sub>4</sub>	Abaetuba
		Aberdeen
		Cannstatt
		Llandoff
		Senftenberg, verzögert Lac. +
		I 1, 3, 19, : - : -
	F	Chandans (2 Isolate getestet)
		Kisarawe
		Krefeld
		Liverpool
		Rubislaw
		Senftenberg

		Solt
		Telashomer
	G	Grumpensis
		Havana
		Idikan
		Kedougou
		Poona
		Putten
		Worthington
		I 13, 23, : -
	H	Caracas
		Charity
		Lindern
		Onderste poort
		Sundsvall
	I	Gaminara
		Hvittingfoss
		Malstatt
		Saphra
	J	Bonames
	K	Cerro
	L	Minnesota (2 Isolate getestet)
		Ruiru
	M	Cotham
		Guildford
		Ilala
		Loeben
		Mundonobo
		Nima
		Patience
		Pomona
		Taunton
		Wedding

	N	Aqua
		Morningside
		Urbana
	O	Adelaide
		Alachua
		Ealing
		Haga
		Monschau
	P	Lansing
		Roan (2 Isolate getestet)
		Shettfield
	Q	Kokomelemle
	R	Johannesburg
	S	Waycross (2 Isolate getestet)
	T	Waral
	U	Thetford
	V	Koketime (2 Isolate getestet)
		Lawra
	W	Suelldorf
	X	I 47, z <sub>4</sub> , z <sub>23</sub> : - (monophasisch)
		Mountpleasant
<i>S. enterica</i> subsp. <i>salamae</i>	B	II 4, 12 : a : -
	C <sub>1</sub>	II 6, 7 : d : 1,7
	F	II 11 : g, m, s, t: z <sub>39</sub>
	I	II 16 : g, m, s, t: -
	J	II 17 : c : z <sub>39</sub>
		II 17 : b : e, n, x, z <sub>15</sub>

		L	II 21 : z <sub>10</sub> : -
		P	II 38 : d : 1, 5
		R	II 1, 40 : z <sub>42</sub> : 1, 5, 7
		S	II 41 : z <sub>10</sub> , 1, 2
		T	II 42 : r : - (3 Isolate getestet)
		X	II 47 : a : 1, 5 (2 Isol. getestet)
			II 47 : b : 1, 5 (2 Isol. getestet)
			II 47 : b : z <sub>6</sub>
		Z	II 50 : b : z <sub>6</sub> (5 Isolate getestet)
		O : 58	II 58 : l, z <sub>13</sub> , z <sub>28</sub> : z <sub>6</sub>
<i>S. enterica</i> subsp. <i>arizonae</i>		J	IIIa 17 : z <sub>4</sub> , z <sub>32</sub> : -
		K	IIIa 18 : z <sub>4</sub> , z <sub>23</sub> : -
		P	IIIa 38 : l, v : -
		R	IIIa 40 : z <sub>4</sub> , z <sub>24</sub> : -
		S	IIIa 41 : z <sub>4</sub> , z <sub>23</sub> : -
		U	IIIa 43 : g, z <sub>51</sub> : -
		V	IIIa 44 : z <sub>4</sub> , z <sub>32</sub> : -
			IIIa 44 : z <sub>41</sub> , z <sub>23</sub> : -
		Y	IIIa 48 : (1) : -
			IIIa 48 : g, z <sub>51</sub> : -
			IIIa 48 : z <sub>36</sub> : -
			IIIa 48 : z <sub>4</sub> , z <sub>23</sub> : -
		Z	IIIa 50 : z <sub>4</sub> , z <sub>24</sub> : -
		O : 51	IIIa 51 : z <sub>4</sub> , z <sub>23</sub> : -
			IIIa 51 : g, z <sub>51</sub> : -
		O : 53	IIIa 53 : z <sub>4</sub> , z <sub>23</sub> , z <sub>32</sub> : -
			IIIa 53 : z <sub>29</sub> : -
		O : 62	IIIa 62 : z <sub>36</sub> : -

		O : 63	IIIa 63 : g, z <sub>51</sub> : -
	<i>S. enterica</i> subsp. <i>diarizonae</i>	D <sub>1</sub>	IIIb 1, 9, 12 : y : z <sub>39</sub>
		I	IIIb 16 : k : -
		J	IIIb 17 : z <sub>10</sub> , e, n, x, z <sub>15</sub>
		O	IIIb 35 : k : e, n, z <sub>15</sub>
		P	IIIb 38 : l, v : z <sub>53</sub>
			IIIb 38 : l, v : z <sub>54</sub>
		T	IIIb 42 : k : z <sub>35</sub>
		X	IIIb 47 : b : z <sub>6</sub>
			IIIb 47 : k : z <sub>35</sub>
			IIIb 47 : r : z <sub>53</sub>
			IIIb 47 : - : -
		Y	IIIb 48 : (k) : z <sub>53</sub>
		Z	IIIb 50 : k : z
			IIIb 50 : r : z
		O : 53	IIIb 53 : l, k : z
		O : 60	IIIb 60 : z <sub>52</sub> : z <sub>53</sub>
		O : 61	IIIb 61 : i : z
			IIIb 61 : l, v : 1, 5, 7
			IIIb 61 : l, v : 1, 5, 7 : (z <sub>57</sub> )
			IIIb 61 : r : z <sub>53</sub>
	<i>S. enterica</i> subsp. <i>houtenae</i>	F	IV 11 : z <sub>4</sub> , z <sub>23</sub> : -
		I	IV 16 : z <sub>4</sub> , z <sub>32</sub> : -
		I	IV 16 : z <sub>4</sub> , z <sub>32</sub> : -
		J	IV 17 : z <sub>29</sub> : -
		K	IV 18 : z <sub>36</sub> , z <sub>38</sub> : -
		L	IV 21 : g, z <sub>51</sub> : -
		U	IV 43 : z <sub>4</sub> , z <sub>23</sub> : -
			IV 43 : z <sub>4</sub> , z <sub>32</sub> : -

		V	IV 44 : z <sub>4</sub> , z <sub>32</sub> : -
		Y	IV 48 : z <sub>29</sub> : -
		Z	IV 50 : z <sub>4</sub> , z <sub>23</sub> : -
	<i>S. enterica</i> subsp. <i>bongori</i>	R	V 40 : z <sub>35</sub> : -
			V 40 : z <sub>81</sub> : -
		V	V 44 : d : -
			V 44 : z <sub>39</sub> : -
		Y	V 48 : z <sub>35</sub> : -
	<i>S. enterica</i> subsp. <i>indica</i>	S	VI 41 : b : 1,7
		W	VI 45 : a : e, n, x, (z <sub>17</sub> )
		Y	VI 48 : z <sub>10</sub> : 1,5
			VI 48 : z <sub>41</sub> : -
			VI 1, v : z <sub>67</sub>

Bezugsquelle: bgVV Berlin, (Robert von Oertel Institut, Marienfelde) und Institut für Mikrobiologie und Hygiene, Hamburg (Prof. Aleksic). Bei den Stämmen mit der Bezeichnung TA handelt es sich um Stämme, die für den Ames Test eingesetzt werden (Maron, D.M. & Ames, B.N., Mutation Research 113, 173-215 (1983)).

Tabelle 1b: Negative Stämme von Nicht-*Salmonella* Spezies bei der PCR-Amplifikation mit den beiden Primerkombinationen 1 oder 2 sowie der nachfolgenden Hybridisierung mit dem Oligonukleotid ST 14

Nr.	Spezies	Herkunft
	<i>Bacillus subtilis</i>	ATCC 6051
	<i>Citrobacter freundii</i>	DSM 30040
	<i>Clostridium bifermentans</i>	DSM 630
	<i>Enterobacter agglomerans</i>	IfGB 0202

	<i>Enterobacter cloacae</i>	DSM 30054
	<i>Erwinia carotovora</i>	DSM 30168
	<i>Escherichia coli</i>	ATCC 8739
	<i>Hafnia alvei</i>	IFGB 0101
	<i>Klebsiella oxytoca</i>	DSM 5175
	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	ATCC 13883
	<i>Klebsiella oxytoca</i>	DSM 5175
	<i>Lactobacillus spec.</i>	ATCC 20182
	<i>Listeria monocytogenes</i>	ATCC 19118
	<i>Pediococcus domnatus</i>	IFGB 0101
	<i>Proteus vulgaris</i>	DSM 2041
	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	DSM 6290
	<i>Serratia marcescens</i>	IFGB 0101
	<i>Shigella flexneri</i>	DSM 4782
	<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 6538
	<i>Yersinia enterocolitica</i>	DSM 4780

**Patentansprüche**

1. Satz von Nucleinsäuremolekülen, mit dem sich bei einem Verfahren zum Nachweis von Vertretern von *Salmonella enterica* subsp. *enterica*, *salamae*, *arizonae*, *diarizonae*, *houtenae*, *bongori* und *indica* sämtliche Vertreter dieser Subspezies nachweisen lassen, dadurch **gewinnbar**, daß man
  - (a) in an sich bekannter Weise mit Hilfe eines Nucleinsäure-Isolats eines Vertreters einer der genannten *Salmonella enterica*-Subspezies ein erstes Nucleinsäuremolekül (Nucleinsäuremolekül 1) gewinnt oder ableitet, das sich spezifisch als Primer oder Sonde zum Nachweis dieses Vertreters oder weiterer oder aller Vertreter dieser einen *Salmonella enterica*-Subspezies und gegebenenfalls zusätzlich von Vertretern weiterer *Salmonella enterica*-Subspezies eignet,
  - (b) in an sich bekannter Weise mit Hilfe eines Nucleinsäure-Isolats eines anderen Vertreters einer der genannten *Salmonella enterica*-Subspezies ein zweites Nucleinsäuremolekül

(Nucleinsäuremolekül 2) gewinnt oder ableitet, das sich spezifisch als Primer oder Sonde zum Nachweis dieses Vertreters oder weiterer oder aller Vertreter dieser anderen *Salmonella enterica*-Subspezies und gegebenenfalls zusätzlich von Vertretern von weiteren der genannten *Salmonella enterica*-Subspezies eignet und

(c) sofern sich mit den gemäß (a) und (b) gewinnbaren Nucleinsäuremolekülen nicht bereits alle Vertreter der genannten *Salmonella enterica*-Subspezies nachweisen lassen, die Gewinnung oder Ableitung von Nucleinsäuremolekülen gemäß (a) und/oder (b) so lange fortsetzt, bis sich mit dem gewonnenen oder abgeleiteten Satz von Nucleinsäuremolekülen alle Vertreter der genannten *Salmonella enterica*-Subspezies nachweisen lassen.

2. Satz von Nucleinsäuremolekülen nach Anspruch 1, dadurch **gekennzeichnet**, daß die Nucleinsäure-Isolate phylogenetisch konservierte Basensequenzen oder Bereiche dieser Basensequenzen umfassen oder darstellen.

3. Satz von Nucleinsäuremolekülen nach Anspruch 1 oder 2, dadurch **gekennzeichnet**, daß die einzelnen Nucleinsäuremoleküle oder daß einzelne der Nucleinsäuremoleküle

- (i) an verschiedenen phylogenetisch konservierten Basensequenzen oder
- (ii) an einundderselben phylogenetisch konservierten Basensequenz an sich nicht überlappenden Sequenzbereichen oder
- (iii) an einundderselben phylogenetisch konservierten Basensequenz an sich überlappenden Sequenzbereichen hybridisieren.

4. Satz von Nucleinsäuremolekülen, insbesondere nach einem der vorhergehenden Ansprüche, mit dem sich bei einem Verfahren zum Nachweis von Vertretern von *Salmonella enterica* subsp. *enterica*, *salamae*, *arizonae*, *diarizonae*, *houtenae*, *bongori* und *indica*

sämtliche Vertreter dieser Subspezies nachweisen lassen, dadurch **gekennzeichnet**, daß der Satz für ein einzelnes, für mehrere seiner einzelnen oder für jedes seiner einzelnen Nucleinsäuremoleküle jeweils mindestens ein weiteres Nucleinsäuremolekül umfaßt, das in einem Bereich von mindestens 10 aufeinanderfolgenden Nucleotiden ihrer Nucleotidketten in weniger als 100 %, aber zumindest in 80 % der Basensequenz übereinstimmt.

5. Satz nach Anspruch 4, dadurch **gekennzeichnet**, daß der Satz für ein einzelnes, für mehrere seiner einzelnen oder für jedes seiner einzelnen Nucleinsäuremoleküle jeweils mindestens ein weiteres Nucleinsäuremolekül umfaßt, das in einem Bereich von mindestens 10 aufeinanderfolgenden Nucleotiden ihrer Nucleotidketten in genau einer Basenposition vom anderen bzw. weiteren Nucleinsäuremolekül abweicht.

6. Satz nach Anspruch 4 oder 5, dadurch **gekennzeichnet**, daß er ein oder mehrere, jedoch nicht ausschließlich solche Nucleinsäuremoleküle umfaßt, bei denen es sich um Fragmente der SEQ ID NO 1 gemäß WO 95/00 664 oder der hierzu komplementären Sequenz handelt.

7. Satz nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch **gekennzeichnet**, daß die einzelnen Nucleinsäuremoleküle an denselben Strang von Nucleinsäure-Isolaten von Vertretern von *Salmonella enterica*-Subspezies hybridisieren, die dem Verfahren zu ihrem Nachweis unterworfen werden.

8. Nucleinsäuremolekül, das zu einem Satz gemäß einem der vorhergehenden Ansprüche gehört oder für einen derartigen Satz verwendbar ist, dadurch **gekennzeichnet**, daß die Sequenz des Nucleinsäuremoleküls in einem Bereich von mindestens 10 aufeinanderfolgenden Nucleotiden seiner Nucleotidkette exakt mit einem Sequenzbereich mindestens eines Vertreters von *Salmonella enterica*-Subspezies gemäß einem der Ansprüche 1 oder 4 überein-

stimmt, wobei der Sequenzbereich eine phylogenetisch konservierte Basensequenz oder einen Bereich dieser Basensequenz umfaßt oder darstellt.

9. Nucleinsäuremolekül nach Anspruch 8, dadurch **gekennzeichnet**, daß es in einem Bereich von mindestens 10 aufeinanderfolgenden Nucleotiden seiner Nucleotidkette zu 100 % oder zu mindestens 80 % identisch ist zu einer entsprechenden Zahl aufeinanderfolgender Nucleotide einer oder mehrerer der folgenden Sequenzen oder ihrer komplementären Sequenzen:

SEQ ID NO: 1 ATGGATCAGAATACGCCCG  
SEQ ID NO: 2 ATGGATCAGAATACACCCCG  
SEQ ID NO: 3 CAGAATACGCCCGTTCGGC  
SEQ ID NO: 4 CAGAATACACCCGTTCGGC  
SEQ ID NO: 5 CAGAATACGCCCGTTCAAG  
SEQ ID NO: 6 CAACCTAACCTCTGCGCCAG  
SEQ ID NO: 7 CAACCTAACCTCTGCACCAG  
SEQ ID NO: 8 CAACCTAACCTCTGCGCCAG  
SEQ ID NO: 9 CAACCTAACCTCTGCAG  
SEQ ID NO: 10 CAGCCTAACCTCTGCGCCAG

10. Nucleinsäuremolekül, dadurch **gekennzeichnet**, daß es hinsichtlich seiner Sequenz zu einem Nucleinsäuremolekül gemäß einem der vorhergehenden Ansprüche homolog ist und bei mindestens 10 aufeinanderfolgenden Nucleotiden seiner Nucleotidkette

- (i) mit einem Nucleinsäuremolekül gemäß einem der vorhergehenden Ansprüche identisch ist oder
- (ii) in nicht mehr als einem Nucleotid von einem Nucleinsäuremolekül gemäß einem der vorhergehenden Ansprüche abweicht oder
- (iii) in nicht mehr als zwei Nucleotiden von einem Nucleinsäuremolekül gemäß einem der vorhergehenden Ansprüche abweicht.

11. Nucleinsäuremolekül nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch **gekennzeichnet**, daß es 10 bis 250 und vorzugsweise 15 bis 30 Nucleotide lang ist.

12. Nucleinsäuremolekül nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch **gekennzeichnet**, daß es einzelsträngig ist oder einen komplementären Strang aufweist.

13. Nucleinsäuremolekül nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch **gekennzeichnet**, daß es

(i) als DNA oder

(ii) als (i) entsprechende RNA oder

(iii) als PNA vorliegt, wobei des Nucleinsäuremolekül gegebenenfalls in einer für analytische Nachweisverfahren, insbesondere auf Basis von Hybridisierung und/oder Amplifizierung, in an sich bekannten Weise modifiziert oder markiert ist.

14. Nucleinsäuremolekül nach Anspruch 13, dadurch **gekennzeichnet**, daß es sich um ein modifiziertes oder markiertes Nucleinsäuremolekül handelt, bei dem bis zu 20 % der Nucleotide von mindestens 10 aufeinanderfolgenden Nucleotiden seiner Nucleotidkette Bausteine darstellen, die für Sonden und/oder Primer an sich bekannt sind, insbesondere Nucleotide darstellen, die bei Bakterien nicht natürlich vorkommen.

15. Nucleinsäuremolekül nach Anspruch 13 oder 14, dadurch **gekennzeichnet**, daß es sich um ein modifiziertes oder markiertes oder zusätzlich modifiziertes oder markiertes Nucleinsäuremolekül handelt, das in einer für analytische Nachweisverfahren an sich bekannten Weise eine oder mehrere radioaktive Gruppen, farbige Gruppen, fluoreszierende Gruppen, Gruppen zur Immobilisierung an fester Phase, Gruppen für eine indirekte oder direkte Reaktion, insbesondere für eine enzymatische Reaktion, vorzugsweise mit Hilfe von Antikörpern, Antigenen, Enzymen und/oder Substanzen mit Affinität zu Enzymen oder Enzymkomplexen,

und/oder anderweitige an sich bekannte modifizierende oder modifizierte Gruppen nucleinsäureähnlichen Aufbaus aufweist.

16. Kit für analytische Nachweisverfahren, insbesondere zum Nachweis von Bakterien der Gattung *Salmonella*, **gekennzeichnet** durch

- (i) einen Satz von Nucleinsäuremolekülen gemäß einem der Ansprüche 1 bis 7 oder
- (ii) durch ein oder mehrere Nucleinsäuremoleküle gemäß einem der Ansprüche 8 bis 15.

17. Kit nach Anspruch 16, dadurch **gekennzeichnet**, daß der Satz von Nucleinsäuremolekülen synthetisch hergestellt wurde und daß dieser in zumindest zwei voneinander getrennten Syntheseansätzen hergestellt wurde.

18. Kit nach Anspruch 17, dadurch **gekennzeichnet**, daß der Kit keine degenerierten Nucleinsäuremoleküle umfaßt.

19. Verwendung eines Satzes von Nucleinsäuremolekülen gemäß einem der Ansprüche 1 bis 7, eines oder mehrerer Nucleinsäuremoleküle gemäß einem der Ansprüche 8 bis 15 oder eines Kits gemäß einem der Ansprüche 16 bis 18 zum Nachweis der An- oder Abwesenheit von Bakterien, welche einer Gruppe von Bakterien der Gattung *Salmonella* angehören, insbesondere von Vertretern von *Salmonella enterica*-Subspezies gemäß Anspruch 1 oder 4.

20. Verwendung nach Anspruch 19, dadurch **gekennzeichnet**, daß man eine Nucleinsäurehybridisierung und/oder eine Nucleinsäureamplifizierung durchführt.

21. Verwendung nach Anspruch 20, dadurch **gekennzeichnet**, daß man eine Polymerase-Kettenreaktion (PCR) als Nucleinsäureamplifikation durchführt.

22. Verwendung nach Anspruch 19, 20 oder 21, dadurch **gekennzeichnet**, daß man für die nachzuweisenden Bakterien und die nicht-nachzuweisenden Bakterien Unterschiede ihrer genomischen DNA und/oder RNA an mindestens einer Nucleotidposition im Bereich eines Nucleinsäuremoleküls gemäß einem der Ansprüche 8 bis 15 ermittelt und Vertreter einer Gruppe von Bakterien der Gattung *Salmonella* nachweist, insbesondere Vertreter von *Salmonella enterica*-Subspezies gemäß Anspruch 1 oder 4.

## Zusammenfassung

Die vorliegende Erfindung betrifft ein Nucleinsäuremolekül bzw. -moleküle sowie ein Verfahren zum Nachweis von Bakterien der Gattung *Salmonella*. Ferner ist Gegenstand der Erfindung ein Testkit bzw. Testkits zur Durchführung der genannten Nachweisverfahren.

09/485434  
416 Rec'd PCT/PTO 09 FEB 2000

Patentansprüche 1 bis 21  
gemäß Artikel 34 PCT

1. Satz von Nucleinsäuremolekülen, mit dem sich bei einem Verfahren zum Nachweis von Vertretern von *Salmonella enterica* subsp. *enterica*, *salamae*, *arizonae*, *diarizonae*, *houtenae*, *bongori* und *indica* sämtliche Vertreter dieser Subspezies nachweisen lassen, dadurch **gewinnbar**, daß man
  - (a) in an sich bekannter Weise mit Hilfe eines Nucleinsäure-Isolats eines Vertreters einer der genannten *Salmonella enterica*-Subspezies ein erstes Nucleinsäuremolekül (Nucleinsäuremolekül 1) gewinnt oder ableitet, das sich spezifisch als Primer oder Sonde zum Nachweis dieses Vertreters oder weiterer oder aller Vertreter dieser einen *Salmonella enterica*-Subspezies und gegebenenfalls zusätzlich von Vertretern weiterer *Salmonella enterica*-Subspezies eignet,
  - (b) in an sich bekannter Weise mit Hilfe eines Nucleinsäure-Isolates eines anderen Vertreters einer der genannten *Salmonella enterica*-Subspezies ein zweites Nucleinsäuremolekül (Nucleinsäuremolekül 2) gewinnt oder ableitet, das sich spezifisch als Primer oder Sonde zum Nachweis dieses Vertreters oder weiterer oder aller Vertreter dieser anderen *Salmonella enterica*-Subspezies und gegebenenfalls zusätzlich von Vertretern von weiteren der genannten *Salmonella enterica*-Subspezies eignet und

- (c) sofern sich mit den gemäß (a) und (b) gewinnbaren oder ableitbaren Nucleinsäuremolekülen nicht bereits alle Vertreter der genannten *Salmonella enterica*-Subspezies nachweisen lassen, die Gewinnung oder Ableitung von Nucleinsäuremolekülen gemäß (a) und/oder (b) so lange fortsetzt, bis sich mit dem gewonnenen oder abgeleiteten Satz von Nucleinsäuremolekülen alle Vertreter der genannten *Salmonella enterica*-Subspezies nachweisen lassen, wobei
- (d) die Nucleinsäure-Isolate phylogenetisch konservierte Basensequenzen oder Bereiche dieser Basensequenzen umfassen oder darstellen, wobei
- (e) der Satz von Nucleinsäuremolekülen ausgehend von den Nucleinsäuremolekülen, die gemäß den Stufen (a) bis (d) gewinnbar oder ableitbar sind, synthetisch und in zumindest zwei voneinander getrennten Syntheseansätzen hergestellt wurden, wobei
- (f) die einzelnen Nucleinsäuremoleküle oder einzelne der Nucleinsäuremoleküle
  - (i) an verschiedenen phylogenetisch konservierten Basensequenzen oder
  - (ii) an ein und derselben phylogenetisch konservierten Basensequenz an sich nicht überlappenden Sequenzbereichen oder
  - (iii) an ein und derselben phylogenetisch konservierten Basensequenz an sich überlappenden Sequenzbereichen hybridisieren und wobei
- (g) der Satz für ein einzelnes, für mehrere seiner einzelnen oder für jedes seiner einzelnen Nucleinsäuremoleküle jeweils mindestens ein weiteres Nucleinsäuremolekül umfaßt, das in einem Bereich von mindestens 10 aufeinanderfolgenden Nucleotiden ihrer Nucleotidketten in weniger als 100 %, aber zumindest in 80 % der Basensequenz übereinstimmt.

2. Satz von Nucleinsäuremolekülen, mit dem sich bei einem Verfahren zum Nachweis von Vertretern von *Salmonella enterica*

subsp. *enterica*, *salamae*, *arizonae*, *diarizonae*, *houtenae*, *bongori* und *indica* sämtliche Vertreter dieser Subspezies nachweisen lassen, dadurch **gewinnbar**, daß man

- (a) in an sich bekannter Weise mit Hilfe eines Nucleinsäure-Isolats eines Vertreters einer der genannten *Salmonella enterica*-Subspezies ein erstes Nucleinsäuremolekül (Nucleinsäuremolekül 1) gewinnt oder ableitet, das sich spezifisch als Primer oder Sonde zum Nachweis dieses Vertreters oder weiterer oder aller Vertreter dieser einen *Salmonella enterica*-Subspezies und gegebenenfalls zusätzlich von Vertretern weiterer *Salmonella enterica*-Subspezies eignet,
- (b) in an sich bekannter Weise mit Hilfe eines Nucleinsäure-Isolates eines anderen Vertreters einer der genannten *Salmonella enterica*-Subspezies ein zweites Nucleinsäuremolekül (Nucleinsäuremolekül 2) gewinnt oder ableitet, das sich spezifisch als Primer oder Sonde zum Nachweis dieses Vertreters oder weiterer oder aller Vertreter dieser anderen *Salmonella enterica*-Subspezies und gegebenenfalls zusätzlich von Vertretern von weiteren der genannten *Salmonella enterica*-Subspezies eignet und
- (c) sofern sich mit den gemäß (a) und (b) gewinnbaren oder ableitbaren Nucleinsäuremolekülen nicht bereits alle Vertreter der genannten *Salmonella enterica*-Subspezies nachweisen lassen, die Gewinnung oder Ableitung von Nucleinsäuremolekülen gemäß (a) und/oder (b) so lange fortsetzt, bis sich mit dem gewonnenen oder abgeleiteten Satz von Nucleinsäuremolekülen alle Vertreter der genannten *Salmonella enterica*-Subspezies nachweisen lassen, wobei
- (d) die Nucleinsäure-Isolate phylogenetisch konservierte Basensequenzen oder Bereiche dieser Basensequenzen umfassen oder darstellen, wobei
- (e) die einzelnen Nucleinsäuremoleküle oder einzelne der Nucleinsäuremoleküle
  - (i) an verschiedenen phylogenetisch konservierten Basensequenzen oder

- (ii) an einundderselben phylogenetisch konservierten Basensequenz an sich nicht überlappenden Sequenzbereichen oder
- (iii) an einundderselben phylogenetisch konservierten Basensequenz an sich überlappenden Sequenzbereichen hybridisieren, wobei
- (f) der Satz für ein einzelnes, für mehrere seiner einzelnen oder für jedes seiner einzelnen Nucleinsäuremoleküle jeweils mindestens ein weiteres Nucleinsäuremolekül umfaßt, das in einem Bereich von mindestens 10 aufeinanderfolgenden Nucleotiden ihrer Nucleotidketten in weniger als 100 %, aber zumindest in 80 % der Basensequenz übereinstimmt, und wobei
- (g) der Saft von Nucleinsäuremolekülen keine degenerierten Nucleinsäuremoleküle umfaßt.

3. Satz von Nucleinsäuremolekülen, mit dem sich bei einem Verfahren zum Nachweis von Vertretern von *Salmonella enterica* subsp. *enterica*, *salamae*, *arizona*, *diarizonae*, *houtenae*, *bongori* und *indica* sämtliche Vertreter dieser Subspezies nachweisen lassen, dadurch **gewinnbar**, daß man

- (a) in an sich bekannter Weise mit Hilfe eines Nucleinsäure-Isolats eines Vertreters einer der genannten *Salmonella enterica*-Subspezies ein erstes Nucleinsäuremolekül (Nucleinsäuremolekül 1) gewinnt oder ableitet, das sich spezifisch als Primer oder Sonde zum Nachweis dieses Vertreters oder weiterer oder aller Vertreter dieser einen *Salmonella enterica*-Subspezies und gegebenenfalls zusätzlich von Vertretern weiterer *Salmonella enterica*-Subspezies eignet,
- (b) in an sich bekannter Weise mit Hilfe eines Nucleinsäure-Isolates eines anderen Vertreters einer der genannten *Salmonella enterica*-Subspezies ein zweites Nucleinsäuremolekül (Nucleinsäuremolekül 2) gewinnt oder ableitet, das sich spezifisch als Primer oder Sonde zum Nachweis dieses Vertreters oder weiterer oder aller Vertreter dieser anderen *Salmonella enterica*-Subspezies und gegebenenfalls zusätzlich von Ver-

tretern von weiteren der genannten *Salmonella enterica*-Subspezies eignet und

- (c) sofern sich mit den gemäß (a) und (b) gewinnbaren oder ableitbaren Nucleinsäuremolekülen nicht bereits alle Vertreter der genannten *Salmonella enterica*-Subspezies nachweisen lassen, die Gewinnung oder Ableitung von Nucleinsäuremolekülen gemäß (a) und/oder (b) so lange fortsetzt, bis sich mit dem gewonnenen oder abgeleiteten Satz von Nucleinsäuremolekülen alle Vertreter der genannten *Salmonella enterica*-Subspezies nachweisen lassen, wobei
- (d) die Nucleinsäure-Isolate phylogenetisch konservierte Basensequenzen oder Bereiche dieser Basensequenzen umfassen oder darstellen, wobei
- (e) die einzelnen Nucleinsäuremoleküle oder einzelne der Nucleinsäuremoleküle
  - (i) an verschiedenen phylogenetisch konservierten Basensequenzen oder
  - (ii) an einundderselben phylogenetisch konservierten Basensequenz an sich nicht überlappenden Sequenzbereichen oder
  - (iii) an einundderselben phylogenetisch konservierten Basensequenz an sich überlappenden Sequenzbereichen hybridisieren, wobei
- (f) der Satz für ein einzelnes, für mehrere seiner einzelnen oder für jedes seiner einzelnen Nucleinsäuremoleküle jeweils mindestens ein weiteres Nucleinsäuremolekül umfaßt, das in einem Bereich von mindestens 10 aufeinanderfolgenden Nucleotiden ihrer Nucleotidketten in weniger als 100 %, aber zumindest in 80 % der Basensequenz übereinstimmt und wobei
- (g) der Satz von Nucleinsäuremolekülen nur komplementierende Primer umfaßt.

4. Satz nach Anspruch 1, 2 oder 3, dadurch *gekennzeichnet*, daß der Satz für ein einzelnes, für mehrere seiner einzelnen oder für jedes seiner einzelnen Nucleinsäuremoleküle jeweils minde-

stens ein weiteres Nucleinsäuremolekül umfaßt, das in einem Bereich von mindestens 10 aufeinanderfolgenden Nucleotiden ihrer Nucleotidketten in genau einer Basenposition vom anderen bzw. weiteren Nucleinsäuremolekül abweicht.

5. Satz nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch **gekennzeichnet**, daß er ein oder mehrere, jedoch nicht ausschließlich solche Nucleinsäuremoleküle umfaßt, bei denen es sich um Fragmente der SEQ ID NO 1 gemäß WO 95/00 664 oder der hierzu komplementären Sequenz handelt.

6. Satz nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch **gekennzeichnet**, daß die einzelnen Nucleinsäuremoleküle an denselben Strang von Nucleinsäure-Isolaten von Vertretern von *Salmonella enterica*-Subspezies hybridisieren, die dem Verfahren zu ihrem Nachweis unterworfen werden.

7. Nucleinsäuremolekül, das zu einem Satz gemäß einem der vorhergehenden Ansprüche gehört oder für einen derartigen Satz verwendbar ist, dadurch **gekennzeichnet**, daß die Sequenz des Nucleinsäuremoleküls in einem Bereich von mindestens 10 aufeinanderfolgenden Nucleotiden seiner Nucleotidkette exakt mit einem Sequenzbereich mindestens eines Vertreters von *Salmonella enterica*-Subspezies gemäß einem der Ansprüche 1, 2 oder 3 übereinstimmt, wobei der Sequenzbereich eine phylogenetisch konservierte Basensequenz oder einen Bereich dieser Basensequenz umfaßt oder darstellt.

8. Nucleinsäuremolekül nach Anspruch 7, dadurch **gekennzeichnet**, daß es in einem Bereich von mindestens 10 aufeinanderfolgenden Nucleotiden seiner Nucleotidkette zu 100 % oder zu mindestens 80 % identisch ist zu einer entsprechenden Zahl aufeinanderfolgender Nucleotide einer oder mehrerer der folgenden Sequenzen oder ihrer komplementären Sequenzen:

SEQ ID NO: 1 ATGGATCAGAATACGCCCG  
SEQ ID NO: 2 ATGGATCAGAATACACCCCG  
SEQ ID NO: 3 CAGAATACGCCCGTTCGGC  
SEQ ID NO: 4 CAGAATACACCCCGTTCGGC  
SEQ ID NO: 5 CAGAATACGCCCGTTCAGC  
SEQ ID NO: 6 CAACCTAACTTCTGCGCCAG  
SEQ ID NO: 7 CAACCTAACTTCTGCACCAG  
SEQ ID NO: 8 CAACCTAACCTCTGCGCCAG  
SEQ ID NO: 9 CAACCTAACTTCTGCGGCAG  
SEQ ID NO: 10 CAGCCTAACTTCTGCGCCAG

9. Nucleinsäuremolekül, dadurch *gekennzeichnet*, daß es hinsichtlich seiner Sequenz zu einem Nucleinsäuremolekül gemäß einem der Ansprüche 7 oder 8 homolog ist und bei mindestens 10 aufeinanderfolgenden Nucleotiden seiner Nucleotidkette

- (i) mit einem Nucleinsäuremolekül gemäß einem der Ansprüche 7 oder 8 identisch ist oder
- (ii) in nicht mehr als einem Nucleotid von einem Nucleinsäuremolekül gemäß einem der Ansprüche 7 oder 8 abweicht oder
- (iii) in nicht mehr als zwei Nucleotiden von einem Nucleinsäuremolekül gemäß einem der Ansprüche 7 oder 8 abweicht.

10. Nucleinsäuremolekül nach einem der Ansprüche 7 bis 9, dadurch *gekennzeichnet*, daß es 10 bis 250 und vorzugsweise 15 bis 30 Nucleotide lang ist.

11. Nucleinsäuremolekül nach einem der Ansprüche 7 bis 10, dadurch *gekennzeichnet*, daß es einzelsträngig ist oder einen komplementären Strang aufweist.

12. Nucleinsäuremolekül nach einem der Ansprüche 7 bis 11, dadurch *gekennzeichnet*, daß es

- (i) als DNA oder
- (ii) als (i) entsprechende RNA oder

(iii) als PNA vorliegt, wobei des Nucleinsäuremolekül gegebenenfalls in einer für analytische Nachweisverfahren, insbesondere auf Basis von Hybridisierung und/oder Amplifizierung, in an sich bekannten Weise modifiziert oder markiert ist.

13. Nucleinsäuremolekül nach Anspruch 12, dadurch **gekennzeichnet**, daß es sich um ein modifiziertes oder markiertes Nucleinsäuremolekül handelt, bei dem bis zu 20 % der Nucleotide von mindestens 10 aufeinanderfolgenden Nucleotiden seiner Nucleotidkette Bausteine darstellen, die für Sonden und/oder Primer an sich bekannt sind, insbesondere Nucleotide darstellen, die bei Bakterien nicht natürlich vorkommen.

14. Nucleinsäuremolekül nach Anspruch 12 oder 13, dadurch **gekennzeichnet**, daß es sich um ein modifiziertes oder markiertes oder zusätzlich modifiziertes oder markiertes Nucleinsäuremolekül handelt, das in einer für analytische Nachweisverfahren an sich bekannten Weise eine oder mehrere radioaktive Gruppen, farbige Gruppen, fluoreszierende Gruppen, Gruppen zur Immobilisierung an fester Phase, Gruppen für eine indirekte oder direkte Reaktion, insbesondere für eine enzymatische Reaktion, vorzugsweise mit Hilfe von Antikörpern, Antigenen, Enzymen und/oder Substanzen mit Affinität zu Enzymen oder Enzymkomplexen, und/oder anderweitige an sich bekannte modifizierende oder modifizierte Gruppen nucleinsäureähnlichen Aufbaus aufweist.

15. Kit für analytische Nachweisverfahren, zum Nachweis von Bakterien der Gattung *Salmonella*, **gekennzeichnet** durch

- (i) einen Satz von Nucleinsäuremolekülen gemäß einem der Ansprüche 1 bis 6 oder
- (ii) durch ein oder mehrere Nucleinsäuremoleküle gemäß einem der Ansprüche 7 bis 14.

16. Kit nach Anspruch 15, dadurch **gekennzeichnet**, daß der Satz von Nucleinsäuremolekülen synthetisch hergestellt wurde und daß

dieser in zumindest zwei voneinander getrennten Syntheseansätzen hergestellt wurde.

17. Kit nach Anspruch 16, dadurch *gekennzeichnet*, daß der Kit keine degenerierten Nucleinsäuremoleküle umfaßt.

18. Verwendung eines Satzes von Nucleinsäuremolekülen gemäß einem der Ansprüche 1 bis 6, eines oder mehrerer Nucleinsäuremoleküle gemäß einem der Ansprüche 7 bis 14 oder eines Kits gemäß einem der Ansprüche 15 bis 17 zum Nachweis der An- oder Abwesenheit von Bakterien, welche Vertretern von *Salmonella enterica*-Subspezies gemäß Anspruch 1, 2 oder 3 angehören.

19. Verwendung nach Anspruch 18, dadurch *gekennzeichnet*, daß man eine Nucleinsäurehybridisierung und/oder eine Nucleinsäureamplifizierung durchführt.

20. Verwendung nach Anspruch 19, dadurch *gekennzeichnet*, daß man eine Polymerase-Kettenreaktion (PCR) als Nucleinsäureamplifikation durchführt.

21. Verwendung nach Anspruch 18, 19 oder 20, dadurch *gekennzeichnet*, daß man für die nachzuweisenden Bakterien und die nicht-nachzuweisenden Bakterien Unterschiede ihrer genomischen DNA und/oder RNA an mindestens einer Nucleotidposition im Bereich eines Nucleinsäuremoleküls gemäß einem der Ansprüche 7 bis 14 ermittelt und Vertreter einer Gruppe von Bakterien der Gattung *Salmonella* nachweist, insbesondere Vertreter von *Salmonella enterica*-Subspezies gemäß Anspruch 1, 2 oder 3.

09/485434

416 Rec'd PCT/PTO 09 FEB 2000

IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

I, LOUISE MAY KEILLER, M.A., M.I.L., declare

1. That I am a citizen of the United Kingdom of Great Britain and Northern Ireland, residing at 47 Guildford Park Avenue, Guildford, Surrey, GU2 5NL.
2. That I am well acquainted with the German and English languages.
3. That the attached is a true translation into the English language of the Specification of International Patent Application No. PCT/EP98/05129 as originally filed.
4. That all statements made herein of my own knowledge are true and that all statements made on information and belief are believed to be true; and further that these statements are made with the knowledge that wilful false statements and the like so made are punishable by fine or imprisonment, or both, under Section 1001 of Title 18 of the United States Code and that such wilful false statements may jeopardise the validity of the patent application in the United States of America or any patent issuing thereon.

DECLARED THIS 3<sup>rd</sup> DAY OF FEBRUARY 2000

*Louise M. Keiller*

LOUISE M. KEILLER

09/485434

416 Rec'd PCT/PTO 09 FEB 2000

SEQUENZPROTOKOLL

(1) ALLGEMEINE ANGABEN:

(i) ANMELDER:

(A) NAME: Biotecon Gesellschaft fuer Biotechnologische  
Entwicklung und Consulting mbH

(B) STRASSE: Gustav-Meyer-Allee 25

(C) ORT: Berlin

(E) LAND: Deutschland

(F) POSTLEITZAHL: 13355

(A) NAME: Cornelia Berghof

(B) STRASSE: Rhodelaenderweg 85

(C) ORT: Berlin

(E) LAND: Deutschland

(F) POSTLEITZAHL: 12355

(A) NAME: Alexander Gasch

(B) STRASSE: Steegerstr. 71

(C) ORT: Berlin

(E) LAND: Deutschland

(F) POSTLEITZAHL: 13359

(A) NAME: Pia Scheu

(B) STRASSE: Boelckeestr. 45

(C) ORT: Berlin

(E) LAND: Deutschland

(F) POSTLEITZAHL: 12101

(A) NAME: Freimut Wilborn

(B) STRASSE: Neue Kantstr. 9

(C) ORT: Berlin

(E) LAND: Deutschland

(F) POSTLEITZAHL: 14057

(ii) BEZEICHNUNG DER ERFINDUNG: Nucleinsaeuremolekuel-Satz fuer  
Salmonella-Nachweis, Nucleinsaeuren, Kit und Verwendung

(iii) ANZAHL DER SEQUENZEN: 13

(iv) COMPUTER-LESBARE FASSUNG:

(A) DATENTRÄGER: Floppy disk

(B) COMPUTER: IBM PC compatible

(C) BETRIEBSSYSTEM: PC-DOS/MS-DOS

(D) SOFTWARE: PatentIn Release #1.0, Version #1.30 (EPA)

(v) DATEN DER JETZIGER ANMELDUNG:

ANMELDENUMMER: WO 98/05129

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 1:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 20 Basenpaare

(B) ART: Nucleotid

(C) STRANGFORM: Einzelstrang

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Sonstige Nucleinsäure

(A) BESCHREIBUNG: /desc = "Primer"

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(iv) ANTISENSE: NEIN

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 1:

ATGGATCAGA ATACGCCCG

20

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 2:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 20 Basenpaare
- (B) ART: Nucleotid
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Sonstige Nucleinsäure  
(A) BESCHREIBUNG: /desc = "Primer"

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(iv) ANTISENSE: NEIN

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 2:

ATGGATCAGA ATACACCCCG

20

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 3:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 20 Basenpaare
- (B) ART: Nucleotid
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Sonstige Nucleinsäure  
(A) BESCHREIBUNG: /desc = "Primer"

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(iv) ANTISENSE: NEIN

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 3:

CAGAATACGC CCCGTTGGC

20

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 4:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 20 Basenpaare
- (B) ART: Nucleotid
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Sonstige Nucleinsäure  
(A) BESCHREIBUNG: /desc = "Primer"

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(iv) ANTISENSE: NEIN

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 4:

CAGAATAACAC CCCGTTCGGC

20

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 5:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 20 Basenpaare
- (B) ART: Nucleotid
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Sonstige Nucleinsäure  
(A) BESCHREIBUNG: /desc = "Primer"

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(iv) ANTISENSE: NEIN

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 5:

CAGAATAACGC CCCGTTCAGC

20

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 6:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 20 Basenpaare
- (B) ART: Nucleotid
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Sonstige Nucleinsäure  
(A) BESCHREIBUNG: /desc = "Primer"

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(iv) ANTISENSE: NEIN

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 6:

CAACCTAACT TCTGCGCCAG

20

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 7:

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
  - (A) LÄNGE: 20 Basenpaare
  - (B) ART: Nucleotid
  - (C) STRANGFORM: Einzelstrang
  - (D) TOPOLOGIE: linear
- (ii) ART DES MOLEKÜLS: Sonstige Nucleinsäure
  - (A) BESCHREIBUNG: /desc = "Primer"
- (iii) HYPOTHETISCH: NEIN
- (iv) ANTISENSE: NEIN

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 7:

CAACCTAACT TCTGCACCAAG

20

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 8:

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
  - (A) LÄNGE: 20 Basenpaare
  - (B) ART: Nucleotid
  - (C) STRANGFORM: Einzelstrang
  - (D) TOPOLOGIE: linear
- (ii) ART DES MOLEKÜLS: Sonstige Nucleinsäure
  - (A) BESCHREIBUNG: /desc = "Primer"
- (iii) HYPOTHETISCH: NEIN
- (iv) ANTISENSE: NEIN

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 8:

CAACCTAACCC TCTGCGCCAG

20

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 9:

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
  - (A) LÄNGE: 20 Basenpaare
  - (B) ART: Nucleotid
  - (C) STRANGFORM: Einzelstrang
  - (D) TOPOLOGIE: linear
- (ii) ART DES MOLEKÜLS: Sonstige Nucleinsäure
  - (A) BESCHREIBUNG: /desc = "Primer"
- (iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(iv) ANTISENSE: NEIN

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 9:

CAACCTAACT TCTGCGCCAG

20

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 10:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 20 Basenpaare
- (B) ART: Nucleotid
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Sonstige Nucleinsäure

- (A) BESCHREIBUNG: /desc = "Primer"

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(iv) ANTISENSE: NEIN

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 10:

CAGCCTAACT TCTGCGCCAG

20

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 11:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 25 Basenpaare
- (B) ART: Nucleotid
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Sonstige Nucleinsäure

- (A) BESCHREIBUNG: /desc = "Primer"

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(iv) ANTISENSE: NEIN

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 11:

AGCCAACCAT TGCTAAATTG GCGCA

25

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 12:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 24 Basenpaare
- (B) ART: Nucleotid
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Sonstige Nucleinsäure  
(A) BESCHREIBUNG: /desc = "Primer"

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(iv) ANTISENSE: NEIN

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 12:

GGTAGAAATT CCCAGCGGGT ACTG

24

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 13:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:  
(A) LÄNGE: 24 Basenpaare  
(B) ART: Nucleotid  
(C) STRANGFORM: Einzelstrang  
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Sonstige Nucleinsäure  
(A) BESCHREIBUNG: /desc = "Primer"

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(iv) ANTISENSE: NEIN

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 13:

TTTGCAGCTA TCAGGTTACC GTGG

24